

## POTENSI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK (*Annona squamosa* L.) SEBAGAI ANTIFERTILITAS PADA TIKUS PUTIH BETINA GALUR WISTAR

Nur Laili Dwi Hidayati, Rizki Kristianti, dan Ganjar Taufik P.

Prodi S1 Farmasi STIKes Bakti Tunas Husada Tasikmalaya

Jl. Cilolohan No. 36 Tasikmalaya

e-mail : nur.laili81@gmail.com

### ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* L.) sebagai antifertilitas pada tikus putih galur *Wistar*. Tikus putih sebanyak 40 ekor umur 2-3 bulan dikelompokkan berdasarkan Rancangan Acak lengkap dengan perlakuan kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan 3 dosis uji. Tikus putih diberikan perlakuan selama 15 hari selanjutnya hewan uji di bedah diambil uterusnya untuk dibuat preparat histologis. Parameter yang diukur adalah banyaknya fase tiap siklus estrus, berat basah uterus, indeks uterus, diameter uterus dan tebal uterus. Data dianalisis dengan anova dan dilanjutkan uji LSD. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun srikaya dapat mengganggu siklus estrus dengan memperpendek fase estrus; memperpanjang fase met-estrus; meningkatkan berat basah uterus, meningkatkan indeks uterus, meningkatkan diameter uterus dan meningkatkan tebal uterus. Dosis efektif yang memberikan efek antifertilitas adalah 0,038mg/200 gram BB tikus.

Kata kunci : Ekstrak etanol, antifertilitas, daun srikaya (*Annona squamosa* L.)

### PENDAHULUAN

#### 1.1. Latar Belakang

Penggunaan obat antifertilitas bertujuan untuk mengurangi kesuburan dengan cara pertemuan antara sel telur dengan spermatozoa. Pengendalian kesuburan pada dasarnya merupakan usaha untuk mencegah kehamilan pada manusia, ada beberapa cara pengendalian kesuburan seperti menunda perkawinan, sistem berkala, penggunaan kondom, penggunaan obat spermisida/pil vagina (Kemenkes, 2003), kontrasepsi hormonal, AKDR (Alat Kontrasepsi Dalam Rahim) dan sterilisasi (vasektomi dan tubektomi) (Wardoyo, 1990).

Penggunaan berbagai metode kontrasepsi masih dikeluhkan oleh masyarakat karena dapat memberikan efek samping. Penggunaan pantang berkala yang terlampaui lama dapat menimbulkan frustrasi serta keakuratannya diragukan. Penggunaan kontrasepsi hormonal beresiko terjerangit kanker payudara dan endometriosis. Penggunaan AKDR menimbulkan kejang rahim, nyeri pelvik dan endometriosis. Sterilisasi merupakan metode kontrasepsi yang sifatnya tetap atau menghentikan kehamilan (Prawirohardjo, 1999). Menurut Kemenkes (2003), penggunaan obat antifertilitas/kontrasepsi yang ideal untuk

penggunaan massal sebaiknya efektif tanpa resiko kegagalan, mempunyai efek samping sesedikit mungkin, kerjanya reversibel, mudah didapat, harganya terjangkau, mudah penggunaannya dan tidak memerlukan motivasi terus menerus untuk digunakan.

Eksplorasi suatu sumber bahan kontrasepsi dari bahan alami, terutama dari tanaman dapat dijadikan solusi sebagai bahan pengatur fertilitas. Menurut Nurhuda *et al.* (1995), penggunaan bahan obat-obatan dari tanaman memiliki beberapa keuntungan diantaranya toksisitas rendah, mudah diperoleh, harganya terjangkau dan kurang menimbulkan efek samping. Berbagai senyawa bioaktif pada tumbuhan, khususnya kelompok senyawa-senyawa steroid, alkaloid, isoflavonoid, triterpenoid dan xanthon memiliki khasiat sebagai bahan pengatur fertilitas. Menurut Adnan (2002) dan Kemenkes (2003), pengaruh yang ditimbulkan antara lain antigonadotropin, mengganggu oogenesis maupun spermatogenesis, mencegah terjadinya ovulasi, menghalangi pertemuan ovum dengan spermatozoa, menghambat implantasi (Sabri, 2007), meningkatkan persentase kehilangan gestasi (Sabri, 2007), dan mereduksi jumlah anak sekelaahiran (Sabri, 2007;

Rinidar dan M.Isa, 2007; Siburian dan Rosa, 2009).

Metode yang dapat diterapkan untuk mengevaluasi daya kerja obat antifertilitas khususnya yang bekerja secara hormonal pada wanita yaitu melalui pemantauan kadar darah hormon kelamin yakni hormon estrogen dan progesteron. Kinerja hormon estrogen dapat mempengaruhi siklus reproduksi baik menstruasi/estrus (Sari dan Nunung, 2004; Hidayati dan Tita, 2014; Priatna *et al.*, 2014), uterus/endometrium (Sari dan Nunung, 2004; Agustini *et al.*, 2005; Puspitadewi dan Sunarno, 2007; Kusmara *et al.*, 2007; Soegiarso dan Endang, 2008; Hidayati dan Tita, 2013; Priatna *et al.*, 2014), oogenesis maupun ovulasi.

Berdasarkan empiris di masyarakat, daun srikaya dapat digunakan sebagai astringen, antiradang, antelmintik, zat pemicu pematangan bisul, antitumor dan berpotensi sebagai antifertilitas (Djajaneegara dan Prio, 2009). Daun srikaya (*Annona squamosa* L.) mengandung senyawa flavanoid, fenolik, saponin, triterpenoid, steroid, alkaloid dan kumarin (Meri *et al.*, 2013). Senyawa saponin merupakan steroid atau glikosidatriterpenoid.

Efek negatif dari saponin pada reproduksi hewan diketahui sebagai abortivum, menghambat pembentukan zigot dan antiimplantasi (De Padua, 1987 dalam Rusmiati, 2010).

Pengkajian zat aktif yang terdapat pada daun Srikaya melalui skrining fitokimia dan pengujian terhadap hewan uji tentang pengaruhnya sebagai antifertilitas dengan mengevaluasi siklus estrus, efek estrogenik perlu dilakukan. Keteraturan fase siklus estrus dievaluasi dengan melihat keberadaan sel-sel epitel, sel epitel terkornifikasi, dan leukosit pada vagina dengan melakukan apus vagina (Turner dan Bagnara 1976; Marcondes *et al.*, 2002; Grenblatt, 1966 dalam Sari dan Nunung, 2004). Adanya efek estrogenik dievaluasi dengan penimbangan bobot uterus, penebalan uterus dan endometrium (Sa'roni dan Bambang, 2002; May, 1971 dalam Sari dan Nunung, 2004; Puspitadewi dan Sunarno, 2007; Agustini *et al.*, 2007).

## 1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian, dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah pemberian ekstrak etanol daun Srikaya dapat mengganggu siklus estrus pada Tikus Putih betina?
2. Apakah pemberian ekstrak etanol daun Srikaya dapat menimbulkan efek estrogenik pada Tikus Putih betina ?

Berapakah dosis ekstrak etanol daun Srikaya yang paling efektif sebagai antifertilitas ?

## TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

### 1.3. Tujuan Penelitian

Berdasarkan perumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek antifertilitas ekstrak etanol daun Srikaya pada tikus putih betina yang dapat diperoleh dari hasil evaluasi berupa terganggunya siklus estrus; adanya efek estrogenik yang ditandai dengan peningkatan bobot uterus, diameter uterus dan tebal endometrium.

### 1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi untuk dapat digunakan sebagai bahan baku kontrasepsi yang lebih aman bagi kesehatan.

## METODE PENELITIAN

### 1.5. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya yaitu timbangan analitik, gelas kimia, gelas ukur, pipet tetes, tabung reaksi, rak tabung, blander, mortir, stamper, kertas saring, kain flanel, *cotton bud*, gelas objek, mikroskop, sonde oral, *sput*, *disposable*, maserator, perangkat kandang tikus, timbangan tikus, kapas, *rotary evaporator*, dan kamera digital.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun srikaya (*Annona squamosa* L), tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur Wistar, etinil estradiol, metilen biru, NaCl 0,9%, air suling, larutan PGA 1 %, pereaksi Dragendorff, pereaksi Lieberman-Burchard, Mayer, serbuk Mg, HCl 2 N, amilalkohol, etanol 70%, eter, gelatin 1 %, vanilin 10%, asam sulfat pekat, KOH 5%, amonia, kloroform, metanol, asam asetat anhidrat, paraffin, pereaksi Dragendorff,

pereaksi Lieberman-Burchard, pereaksi Mayer, pewarna *Haematoksin-Eosin* dan larutan besi (III) klorida.

#### 1.6. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan 3 kelompok dosis uji. Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih betina galur Wistar dengan jumlah 40 ekor.

#### 1.7. Prosedur Penelitian

##### 1. Determinasi

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun srikaya (*Annona squamosa* L.) yang diperoleh dari Dusun Gudang, Kecamatan Hegarsari Pataruman, Kota Banjar, Jawa Barat. Bahan baku kemudian dipastikan identitasnya di Herbarium Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung.

##### 2. Identifikasi dan Adaptasi Hewan Uji

Hewan uji diidentifikasi di Dinas Pertanian dan Ketahanan Pangan Kota Bandung. Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih betina dewasa dara

galus Wistar berusia 2-3 bulan dengan berat 150-200 gram.

##### 3. Pembuatan Simplisia

Daun srikaya segar dibersihkan terlebih dahulu dari kotoran yang menempel, kemudian dicuci, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari setelah itu dilakukan sortasi. Daun yang sudah dinyatakan bersih dipotong kecil-kecil kemudian dihaluskan hingga diperoleh serbuk daun srikaya. Serbuk tersebut selanjutnya disimpan pada tempat kering dalam wadah tertutup rapat (Depkes, 1985).

##### 4. Pembuatan Ekstrak

Serbuk daun srikaya sebanyak 500 gram diekstraksi dengan cara maserasi dengan pelarut etanol 96% (Harbone, 1987)

5. **Skrining Fitokimia** (Franswoth, 1966): alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, saponin, tannin, monoterpenoid, seskuiterpenoid,

##### 6. Pemberian perlakuan pada Tikus Betina

Tikus putih betina sebanyak 35 ekor dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yang diberi makan dan minum, masing-masing perlakuan sebanyak 7 ekor tikus dengan perlakuan seperti yang tertera pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Perlakuan, sediaan yang diberikan dan jumlah yang diberikan tiap kelompok uji

Perlakuan	Sediaan yang diberikan
Kontrol negatif	Suspensi PGA 1%
Kontrol positif	Suspensi etinil estradiol (1,8 mg/200 BB tikus) dalam PGA 1 %
Dosis uji I	Ekstrak daun srikaya (0,0095 g/200 g BB tikus) dalam PGA 1 %
Dosis uji II	Ekstrak daun srikaya (0,019 g/200 g BB tikus) dalam PGA 1 %
Dosis uji III	Ekstrak daun srikaya (0,038 g/200 g BB tikus) dalam PGA 1 %

#### 7. Pemeriksaan Ulas Vagina

##### a. Pengambilan Sampel Ulas Vagina

Ulas vagina dilakukan dengan cara mengoleskan *cotton bud* yang telah dibasahi NaCl fisiologis 0,9% diusapkan secara perlahan pada dinding vagina tikus sudut  $\pm 45^\circ$  dan diulas sebanyak 1-2 kali putaran. Hasil ulasan dioleskan ke gelas objek yang sebelumnya telah dibersihkan dengan alkohol 70%. Gelas objek dibiarkan beberapa menit agar ulasan mengering, kemudian dilakukan fiksasi dalam metanol selama  $\pm 2$  menit agar sel-sel melekat pada gelas objek. Sediaan dimasukan ke dalam larutan metilen biru selama 25 menit lalu dibilas dengan

menggunakan air mengalir perlahan beberapa detik, kemudian preparat ulas vagina diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran rendah (100x) (Marcondes *et al.*, 2002).

##### Pengamatan Siklus Estrus

Sediaan ulas vagina ditentukan fase siklus estrusnya melalui identifikasi sel epitel, sel epitel terkornifikasi (tanduk) dan leukosit (Ward *et al.*, 2005). Fase proestrus didominasi oleh sel epitel berinti. Fase metestrus didominasi oleh sel tanduk dan leukosit. Fase diestrus yang paling dominan terlihat adalah sel leukosit (Marcondes *et al.* 2002).

### Bobot Uterus dan Indeks Organ

Tikus putih betina dikorbankan dengan cara dislokasi leher, kemudian dilakukan pembedahan (Kemenkes, 1993). Uterus dan ovarium tikus dikeluarkan segera, semua isi uterus dibersihkan dengan NaCl fisiologis. Indeks organ dihitung :

$$\text{Indeks organ} = \frac{\text{Bobot Uterus}}{\text{Bobot Tubuh}} \times 100\%$$

(Angelina *et al*, 2008).

### Pembuatan Preparat Histologi Uterus Tikus Putih Betina

Uterus tikus putih betina dibuat preparat histologis dengan metode paraffin serta pewarnaan menggunakan larutan Mayer's Hematoxylin-Eosin (HE). Tahapan menggunakan metode paraffin meliputi fiksasi, pencucian, dehidrasi, penjernihan (*Clearing*), infiltrasi paraffin, penanaman (*embedding*), pengirisan (*sectioning*), penempelan (*affixing*), pewarnaan (*staining*), penutupan (*mounting*), pemberian label (*labelling*) (Mujimin, 2008; Abdel Warith *et al.*, 2011).

### Pengamatan hasil preparat histologis uterus

Diameter uterus dan tebal endometrium diukur menggunakan micrometer okuler yang telah dikalibrasi terlebih dahulu dengan micrometer objektifnya.

### Pengolahan dan Analisis Data

Data berupa fase siklus estrus, indeks uterus dianalisis secara deskriptif. Lama siklus estrus, bobot uterus, diameter uterus, tebal endometrium dihitung rata-rata dan standar deviasinya dianalisis secara statistik meliputi uji Normalitas, Homogenitas, ANOVA dan uji LSD. (Priyanto, 2009).

### 1.8. Lokasi dan Waktu Penelitian

Kegiatan penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Laboratorium Farmakologi STIKes Bakti Tunas Husada Tasikmalaya dalam jangka waktu 4 bulan.

## II. HASIL DAN PEMBAHASAN

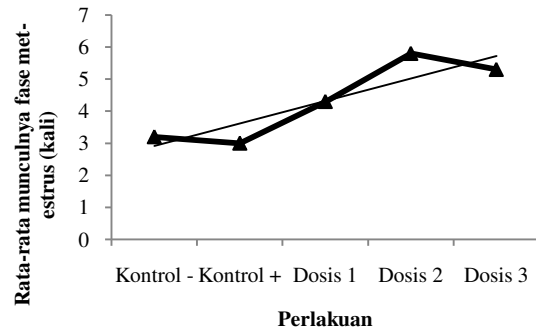
### A. SKRINING FITOKIMIA

Berdasarkan hasil penelitian skrining fitokimia ekstrak etanol daun srikaya mengandung senyawa flavonoid, steroid, saponin, kuinon.

### B. SIKLUS ESTRUS

#### Fase Proestrus

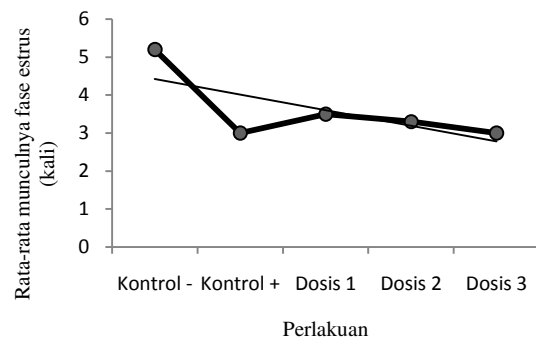
Munculnya fase proestrus menunjukkan hasil yang berbeda seperti yang tertera pada Gambar 4.1.



Berdasarkan uji anova menunjukkan hasil tidak signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun srikaya belum dapat menghambat munculnya fase proestrus sehingga belum berefek sebagai antifertilitas walaupun terdapat kecenderungan penurunan rata-rata munculnya fase proestrus.

#### Fase Estrus

Rata-rata munculnya fase estrus menunjukkan hasil yang berbeda antar perlakuan seperti yang tertera Gambar 4.2.

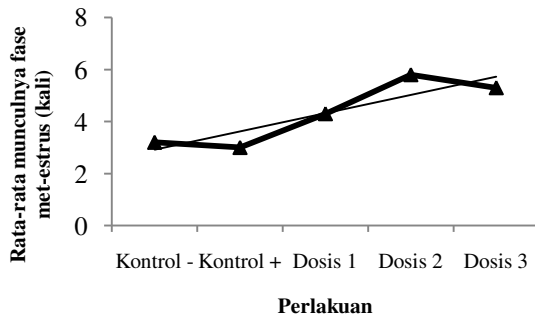


Berdasarkan hasil uji Anova, pada kelompok kontrol positif, dosis I, dosis II dan dosis III memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kontrol negatif. Hasil uji anova menunjukkan bahwa rata-rata munculnya fase estrus pada kontrol positif dibandingkan dengan dosis I, dosis II, dosis III tidak signifikan yang berarti pemberian ekstrak etanol daun srikaya memberikan efek yang sama dengan etinil estradiol dalam penghambatan munculnya fase estrus. Mekanisme etinil estradiol dalam mengganggu fertilitas dengan adanya mekanisme umpan balik negatif (*Feed back negative*) yang ditandai dengan terhambatnya fase estrus. Diduga, steroid

dapat memberikan efek antifertilitas melalui efek umpan balik negatif. Flavonoid dapat berefek sebagai antifertilitas karena sifatnya sebagai fitoestrogen yang melalui efek umpan balik negatif mengganggu terbentuknya sel telur (Ovum).

#### Fase Metestrus

Rata-rata munculnya fase metestrus menunjukkan hasil yang berbeda antar perlakuan seperti yang tertera pada Gambar 4.3.



Berdasarkan hasil uji anova, rata-rata munculnya fase estrus pada dosis 1 tidak signifikan, sedangkan dosis 2 dan 3 signifikan terhadap kontrol negatif. Banyaknya fase metestrus dimungkinkan karena terhambatnya fase estrus sehingga folikel mengalami degenerasi. Rata-rata munculnya fase estrus pada dosis 1 tidak signifikan, sedangkan dosis 2 dan 3 signifikan terhadap kontrol positif.

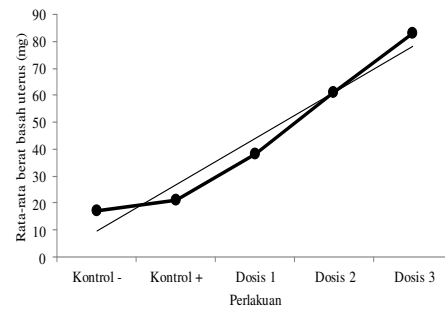
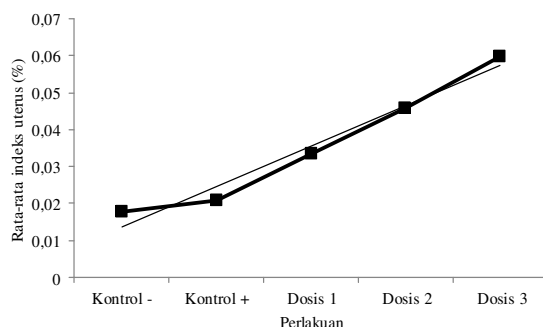
#### Fase Diestrus

Rata-rata munculnya fase diestrus seperti yang tertera pada Gambar 4.4.

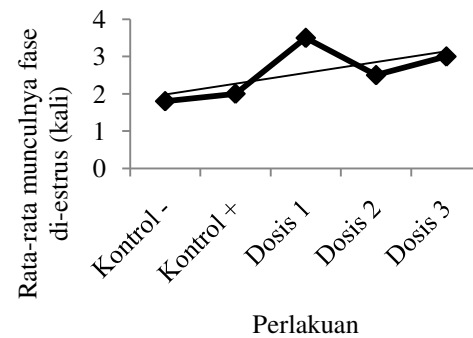
Hasil uji anova menunjukkan hasil yang tidak signifikan sehingga dapat diartikan munculnya fase diestrus pada semua kelompok perlakuan adalah sama.

#### C. BERAT BASAH UTERUS (mg) DAN INDEKS UTERUS (%)

Rata-rata berat basah uterus (mg) dan indeks uterus seperti yang terlihat pada Gambar 4.5. dan Gambar 4.6.



(2003), peningkatan bobot uterus



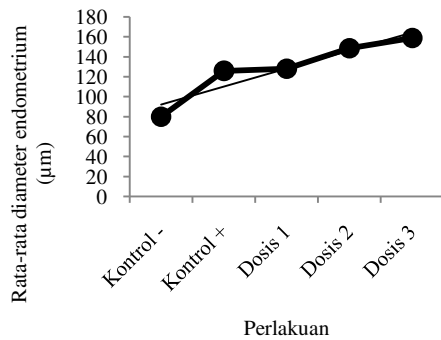
menunjukkan adanya efek estrogenik; sebagai indikator kinerja antifertilitas. Peningkatan berat basah uterus pada dosis uji dimungkinkan karena flavonoid yang dapat merangsang pertumbuhan sel endometrium uterus melalui efek estrogenik (Setiawan, 2010; Akbar, 2010; Meri *et al*, 2013).

Etinil estradiol mengakibatkan peningkatan kadar estrogen dalam darah (Nalbandov, 1990 dalam Suswanto, 2001), yang dapat merangsang peningkatan aktifitas pembelahan sel uterus sehingga massa uterus semakin besar. Selain itu, etinil estradiol mampu menyebabkan penimbunan cairan pada uterus.

#### D. DIAMETER ENDOMETRIUM UTERUS (μm)

Rata-rata diameter uterus nilainya bervariasi antar perlakuan seperti yang tertera pada Gambar 4.7.

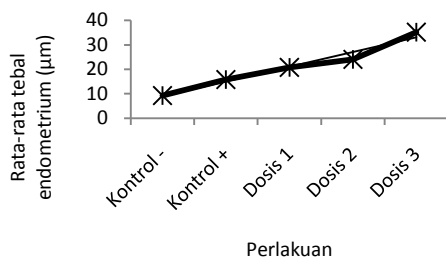
Berdasarkan hasil uji anova, rata-rata diameter uterus kelompok dosis 1, 2 dan 3 memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kontrol negatif. Rata-rata diameter uterus kelompok dosis uji 1 dan 2 menunjukkan penambahan diameter uterus yang sama dengan kontrol positif, sedangkan dosis 3 memberikan efek yang signifikan lebih efektif daripada kelompok kontrol positif. Pemberian etinil estradiol



mampu meningkatkan diameter uterus (Suhargo, 2005). Peningkatan diameter uterus pada kelompok dosis uji disebabkan oleh senyawa metabolit sekunder yaitu steroid dan flavonoid (Meri *et al.*, 2013). Adanya peningkatan diameter uterus merupakan indikasi adanya efek estrogen yang dapat memberikan efek antifertilitas.

#### E. TEBAL ENDOMETRIUM (µm)

Rata-rata tebal endometrium nilainya bervariasi antar perlakuan seperti yang tertera pada Gambar 4.8.



Rata-rata tebal endometrium pada kelompok kontrol positif dan dosis menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif secara signifikan karena senyawa steroid dapat menyebabkan peningkatan proliferasi endometrium dan pergantian sel-sel epitel untuk menutupi permukaan mukosa (Harrison *et al.*, 1999 dalam Primiani 2012). Pemberian ekstrak etanol daun srikaya pada dosis 3 memberikan penambahan tebal endometrium yang paling efektif.

### III. KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* L.) memberikan efek antifertilitas dengan cara memperpendek munculnya fase estrus, memperlama munculnya fase met-estrus,

meningkatkan berat basah uterus, meningkatkan indeks uterus, meningkatkan diameter uterus dan tebal uterus. Dosis uji yang paling efektif adalah dosis 3 0,038 g/200 g BB tikus.

#### B. SARAN

Perlu dilakukan uji toksisitas dosis agar dapat lebih memastikan tingkat keamanan dalam pemakaiannya. Selain itu perlu juga adanya pengukuran kadar estrogen agar lebih maksimal.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Warith, A. A., Younis, E. M., Al-Asgah, N. A., and Wahbi, O. M. Effect of zinc toxicity on liver histology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Scientific Research and Essays*. 2011. Vol. 6(17), pp. 3760-3769.
- Adnan. Potensi Tumbuhan sebagai Bahan Pengatur Fertilitas. Skripsi. 2002. UNM, Makassar.
- Agustina, K., Sumali, W., dan Dadang, K. Efek Estrogenik Biji Klebet (*Trigonella foecum-graecum* L.) terhadap Perkembangan Uterus Tikus Putih Betina. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*. 2005. 4 (2) : 280-285.
- Alex, S. Budidaya dan Khasiat Srikaya Untuk Kesehatan dan Bisnis Makanan. 2011. Yogyakarta: Penerbit Pustaka Baru Press.
- Andriana, Y. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban) terhadap Kadar Hormon Estradiol dan Kadar Hormon Progesteron Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Betina. Tesis. 2012. Ilmu Biomedika.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Cara Pembuatan Simplesia. Djajaneegara I, Prio W. 2009. Pemakaian Sel Hela dalam Uji Sitotoksitas Fraksi Kloroform dan Etanol Ekstrak Daun (*Annona squamosa* L). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 1985. Vol. 7(1), pp. 1693-1831.
- Farnsworth, N. R. Biological and Phytochemical Screening of Plant. *Journal of Pharmaceutical Science*. 1966. 55 (3) : 245-266.

- Harbone JB. Metode Fitokimia. 1987. Bandung. Institut Teknologi Bandung.
- ISFI. 2010. ISO Indonesia. Volume 45. PT ISFI, Jakarta : 277.
- Junqueira, L.C. dan Jose, C. Histologi Dasar Edisi 3. 1987. Jakarta : Buku Kedokteran EGC,
- Kemenkes RI. Penapisan Farmakologi, Pengujian Fitokimia dan Pengujian Klinik. 1993. Kelompok Kerja Ilniah Phyto Medica : 240 p.
- Kusmana, D., R. Lestarii, Setiorini, A.N., Dewi, P.R. Ratri dan R.R.R. Soraya. Efek Estrogenik Ekstrak Etanol 70 % Kunyit (*Curcuma domesticum* Val.) terhadap Mencit (*Mus musculus*) Betina yang Diovarioktomi. Makara Sains. 2007. 11 (2) : 90-97.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, and Tanno AP. Determination of The Estrous Cycle Phases of Rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002. 62(4A):609-614.
- Mujimin. 2008. Histologi Berbagai Jenis/Tingkat Gonad Ikan Kerapu Sunu (*Plectropomus leopardus*). *Bul. Tek. Lit. Akuakultur.* 7 (2) : 101-103.
- Hidayati, N.L.D dan Tita, N. Efek Estrogenik Buah Takokak pada Mencit Putih Betina Galur Swiss Webster. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada.* 2013. 10 (1) : 56-70.
- Hidayati, N.L.D dan Tita, N. Penelusuran Potensi Antifertilitas Buah Takokak (*Solanum torvum* Swartz) Melalui Skrining Fitokimia dan Pengaruhnya terhadap Siklus Estrus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada.* 2014.11 (1) : 94-103.
- Prawirohardjo, S. Ilmu Kebidanan. Edisi Ketiga. 1999. Jakarta : Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo.
- Priatna, M., Tita, N dan Nur, LDH. Potensi Takokak (*Solanum torvum* Swartz) sebagai Antifertilitas pada Tikus Putih. 2014. Laporan Penelitian PDP DIKTI 2013.
- Priyanto, D. 5 Jam Belajar Olah Data dengan SPSS 17. 2009. Yogyakarta : ANDI
- Puspitadewi, S. dan Sunarno. Potensi Agensia Anti Fertilitas Biji Tanaman Jarak (*Jatropha curcas*) dalam Mempengaruhi Profil Uterus Mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster . *Jurnal Sains & Matematika.* 2007. 15 (2) : 55-60.
- Rinidar dan M.Isa. Pengaruh Ekstrak Metanol *Hydroctyle javanica* Thumb Sebagai Kontrasepsi pada Mencit Betina (*Mus musculus*). 2007. Tesis. Universitas umatera Utara, Lampung.
- Rusmiati. Gambaran Struktur Morfologi Spermatozoa Epididimis Mencit setelah Perlakuan dengan Ekstrak Kayu Secang. Laporan Penelitian Proyek Pengembangan Diri (PPD) HEDS. 1999. Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin.
- Sabri, E. Efek Perlakuan Ekstrak Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium*) pada Tahap Praimplantasi terhadap Fertilitas dan Perkembangan Embrio Mencit (*Mus musculus*). *Jurnal Biologi.* 2007. 2 (2) : 28-32.
- Sari, I.P. dan Nunung, Y. Efek Estrogenik dari Ekstrak Etanol Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) pada Tikus. *Majalah Farmasi Indonesia.* 2004. 15(4) : 158-162.
- Soegiarso, N.C. dan Endang,E.W. Efek Estrogenik dari Ekstrak Biji *Foeniculum vulgare* Mill. (Adas). *Warta Tanaman Obat Indonesia.* 2008. 4 (1):13-14.
- Siburian, J dan Rosa, M. Efek Pemberian Ekstrak Akar Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.) pada Tahap Prakopulasi terhadap Fertilitas Mencit (*Mus musculus*). *Bioscience.* 2009. 2(2) : 24-30.
- Toelihere, MR. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. 1985. Bandung :Angkasa.
- Turner dan Bagnara. Endokrinologi Umum. 1980. Yogyakarta: Airlangga University press.
- Ward, J.P.T., R.W. Clarke and R.W.A. Linden. *Physiology at a Glance.* 2005. Blackwell Publishing, USA.